

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-099962

(43)Date of publication of application : 18.04.1995

(51)Int.Cl.

C12M 3/00

(21)Application number : 05-250250

(71)Applicant : NEC CORP

(22)Date of filing : 06.10.1993

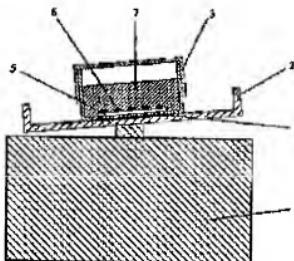
(72)Inventor : MIYAMOTO SHIGEYUKI

## (54) APPARATUS FOR ARRANGING AND CULTURING CELL AND METHOD THEREFOR

## (57)Abstract:

**PURPOSE:** To provide a method for enabling to obtain a cell sequence having high resolution on a substrate by further suppressing adhesion of a cell to the substrate surface processed so as not to bond the cell thereto.

**CONSTITUTION:** A culture vessel 3 in which a substrate 5 having patterns mutually different in cell adhesive property on its surface, a cell 6 and a liquid medium 7 are housed is fixed on a vibrating table 2 of a stirrer 1. Rotation or vibration is given to the culture vessel 3 by the stirrer 1 and culture of the cell 6 is carried out while stirring the liquid medium 7.



(19)日本国特許庁 (JP)

## (22) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-99962

(43)公開日 平成7年(1995)4月18日

(61)InLCl\*  
C12M 3/00識別記号 庁内整理番号  
A

F 1

技術表示箇所

審査請求 有 請求項の数3 O.L (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平5-250250

(71)出願人 000004237

(22)出願日 平成5年(1993)10月6日

日本電気株式会社  
東京都港区芝五丁目7番1号

(72)発明者 富本 進幸

東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株  
式会社内

(74)代理人 弁理士 京本 康樹 (外2名)

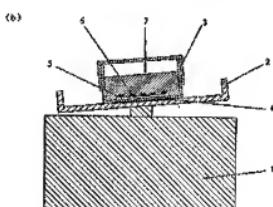
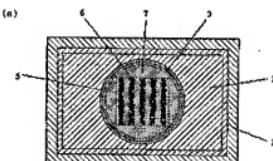
## (54)【発明の名前】 細胞配列接着層およびその方法

## (57)【要約】

【目的】 解像度の高い細胞配列を実現する。

【構成】 細胞接着性の異なるパターンを表面に有する基板1と細胞6と液体培地7が収容された培養容器3が、別途器1の振とう台2の上に固定されている。操作器1によって培養容器3に回転あるいは振動を与えて、液体培地7を搅拌しながら細胞6の培養を行なう。

【効果】 搅拌することにより、基板1上の細胞が接着しにくく加工した表面への細胞の接着をさらに抑制するので、基板1上に解像度の高い細胞配列を得ることができる。



特開平7-99962

(2)

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 繁殖性細胞に対して接着の容易さが異なるパターンを基板表面に有する基板と、前記基板と細胞と前記細胞の生育のための液体培地を収容した培養容器と、前記培養容器内に回転あるいは振動を加える搅拌器とから構成される細胞配列培養装置。

【請求項2】 繁殖性細胞に対して接着の容易さが異なるパターンを基板表面に有する基板と、前記基板と細胞と前記細胞の生育のための液体培地を収容した培養容器と、前記培養容器内の液体培地を搅攪させるポンプとから構成される細胞配列培養装置。

【請求項3】 繁殖性細胞に対して接着の容易さが異なるパターンを基板表面に有する基板と、前記基板と細胞と前記細胞の生育のための液体培地を収容した培養容器と、前記培養容器内の液体培地を搅攪するポンプとから構成される細胞配列培養装置。

【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、細胞を配列して形成されるための細胞配列培養装置およびその方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 現在、いろいろな動物や植物の細胞培養が行われており、また、新たに細胞の培養法が開発されている。細胞培養の技術は、細胞の生化学的性質や性質の解明、有用な物質の生産等の目的で利用されている。さらに、培養細胞を用いて、人工的に合成された薬剤の生産活性や毒性を調べる試みがなされている。

【0003】 一方の細胞特に多くの動物細胞は、何かに接着して生育する接着依存性を有しており、生体外の浮遊状態では長期生存することができない。このような接着依存性を有した細胞の培養には、細胞が接着するための細胞が必要であり、一般的には、コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞接着性タンパク質を均一に塗布したプラスティック製の培養皿が用いられている。これらの細胞接着性タンパク質は、培養細胞に作用し、細胞の接着を容易にしたり、細胞の形態に影響を与えることが知られている。

【0004】 一方、培養細胞は基板上の狭小な部分にのみ接着させ、配列させる技術が報告されている。このような技術により、培養細胞を人工培器やバイオセンサ、バイオリアクターなどに応用することが可能になる。培養細胞を配列させる方法としては、細胞に対して接着の容易さが異なるような複数の表面がパターンを成している基板と、この基板と細胞との細胞の生育のための液体培地を回転した培養容器と、この培養容器内の液体培地を搅攪させるポンプとから構成される細胞配列培養装置である。

【0005】 例えば、特開平2-245181号公報には、回路状に回転細胞を増殖させるなどの目的で、細胞育成パターンを形成させた電荷保持媒体を細胞培養に応用している。また、特開平3-7576号公報では、細胞

非接着性あるいは細胞接着性の光感受性親水性高分子をフォトリソグラフィー法によりパターンングした表面上への培養細胞の配列を試みている。また、細胞非接着性表面を有した細胞培養材料に紫外線や放射線を照射して細胞接着性の官能基を導入したり、細胞培養材料に紫外線や放射線を照射することによって重合開始点を導入し、この上に細胞接着性あるいは細胞接着性モノマーを重合させるなどして表面をパターンングし、これによって細胞の配列を制御した特開平3-7577号公報の例がある。

【0006】 さらに、特開平3-357910号公報書では、細胞の接着率や形態に影響をあたえるコラーゲンなどの物質がパターンングされた細胞培養用基板と、この基板をフォトリソグラフィー法によって作製する方法について開示している。このような基板の上で細胞を培養することによって、コラーゲンなどがパターンングされた表面に多くの細胞を接着させ、細胞のパターンングを実現している。

## 【0007】

【0008】 20【免許が解決しようとする課題】 従来の細胞培養を配列させる方法は、通常の細胞培養方法と同様に、細胞培養の際に細胞や培地を収納した培養容器を静置して培養をおこなっている。しかし、培養容器を静置した状態で培養を行った場合、細胞が接着しないように加工した表面であっても、そこに細胞がまとまると、細胞は細胞外マトリクスを分泌し、その位置で接着する。その結果、細胞の接着を望まない表面にも細胞の接着が生じ、細胞配列の解像度が低下するという問題点がある。

【0009】 20【本発明の目的】 本発明の目的は、上記従来技術の問題点をなくし、解像度の高い細胞配列を実現する細胞配列培養装置およびその方法を提供することにある。

## 【0010】

【課題を解消するための手段】 上記目的を達成するため、本発明による細胞配列培養装置は、接着性細胞に対して接着の容易さが異なるような複数の表面がパターンを成している基板と、この基板と細胞との細胞の生育のための液体培地を回転した培養容器と、この培養容器内の液体培地を搅攪するポンプとから構成される。

【0011】 あるいは、繁殖性細胞に対して接着の容易さが異なるような複数の表面がパターンを成している基板と、この基板と細胞との細胞の生育のための液体培地を回転あるいは振動を加える搅拌器とから構成される。

## 【0012】

(3)

特開平7-99962

3

4

【作用】本発明においては、接着性細胞に対して接着の容易さが異なる複数の表面がパターンを成している基板を用いて、細胞の基質を形成するために、培養を行っている間ずっと、あるいは培養中のある時間培地を搅拌するので、基板上の細胞が接着しやすく加工した表面に細胞が接着しようとしても、培地の流れによってこの表面部分への細胞の接着を防ぐことができる。一方、細胞の強さが強すぎなければ、培地の流れは基板上の細胞の接着しやすく加工した表面への細胞の接着にはほとんど影響を及ぼさない。その結果、細胞が接着しやすく加工した、細胞の接着を基板部分への細胞の接着は実現しながら、細胞が接着しやすく加工した、細胞の接着を望まない表面への細胞の接着を制御することができ、解像度の高い細胞配列を得ることができる。

【0013】

【実施例】次に本発明の実施例について図面を参照して説明する。

【0014】(実施例1) 図1は、第一の発明の細胞配列培養装置の一実施例を示した図で、図1(a)は、底盤の横断面図、図1(b)は底盤の側面断面である。本装置は、複数基板1の端と端と2台の上に培養容器3が粘着テープ4によって固定されている。この培養容器3の中には、基板5上に細胞が配列するようにその表面に接着細胞配列に対する接着の容易さが異なるパターンを有するように加工された基板5と、細胞6と、液体培地7が収納されている。搅拌器1は、振とう台2を水平から10度まで傾けた状態で保持し、振とう台2を毎分20回転から120回転の速度で回転させることができ。培養容器3には直徑4.1mmのポリスチレン製細胞培養皿を使用し。搅拌器1を駆動すると、振とう台2は傾いた状態で回転するので、液体培地7に対して搅拌が加えられる。この搅拌によって、解像度の高い細胞配列を得ることができる。

【0015】本底盤を用いれば、振とう台2の傾きや回転速度を調節することによって、細胞配列の形成に最適な搅拌の強さにすることを容易に行なうことができる。

【0016】粘着テープ4の接着強度は、搅拌によって培養容器3が振とう台2の上を移動したり、振とう台2から離れたりしなければよい。また、培養操作での利便を考慮して、培養容器3は振とう台2から容易に取り外せることを望ましい。このような操作を満たせば、振とう台2への培養容器3の固定手段は粘着テープに限らない。例えば、粘着テープ4の代わりに、ばねによって培養容器3を挟んで固定できるような治具を振とう台2に設けることができる。

【0017】(実施例2) 図2は、第一の発明の細胞配列培養装置の別の一実施例を示した図であり、図2(a)はこの装置の横断面図、図2(b)は装置の側面断面図である。本底盤は、台8の上にスペーサ9を介して搅拌器10が固定されている。搅拌器10には3本の範

11が設けられており、培養容器3はこの範11によつて搅拌器10の上に保持されている。培養容器3の中には、細胞が配列するように表面を加工した基板5と、細胞6と、液体培地7が収納されている。搅拌器10は、株式会社シーエス朝のマイクロ振動モータSE-7Aを、培養容器3には直徑4.1mmのポリスチレン製細胞培養皿を使用した。搅拌器10を駆動することによって生じた振動は、範11を通過して培養容器3に伝えられ、培養容器3の中の液体培地7に対して搅拌が加えられる。これによって、解像度の高い細胞配列を得ることができる。

【0018】本底盤は、搅拌器10に印加する電圧を変えたり、範11と培養容器3の間にあそびを設けることによって搅拌の強さを制御することができる。本底盤は底盤の高さに比べて較密な搅拌の範囲は難しいものの、底盤の大型化が容易な長所がある。

【0019】培養容器3の中の液体培地7を十分に搅拌できる強さの搅拌を生じるものであれば、搅拌モータに限らず、例えば、電圧アクチュエータなどを用いることもできる。

【0020】搅拌によって培養容器3が搅拌器10を移動したり、搅拌器10から離れたりしなければ、搅拌器10への培養容器3の固定手段は範11に限らないが、搅拌操作での利便を考慮して、培養容器3は搅拌器10から容易に取り外せることを望ましい。

【0021】搅拌器10の振動が台8に伝わると、底盤全体が振動し、底盤を安定に設置することができなくなる。そのため、搅拌器10の振動が台8に伝わらないように、スペーサ9の材質はゴムなど搅拌を吸収する材質39が適している。

【0022】(実施例3) 図3は、第二の発明の細胞配列培養装置の一実施例を示し、図3(a)はこの底盤の横断面図、図3(b)は底盤の側面断面である。培養容器3の上部には、導出口12と導入口13が設けられており、導出口12は導出管14、導入管15は導入管15を介してポンプ16と接続されている。培養容器3の中には、実施例1、2で用いた基板と同様に搅拌接着性の異なるパターンを表面に有する基板5と、細胞6と、液体培地7が収納されている。ポンプ16には、東京理化器械株式会社のマイクロチューブポンプMP-3を、培養容器3には直徑4.1mmのポリスチレン製細胞培養皿を使用した。ポンプ16により、培養容器3の中の液体培地7は導出口12から導出管14、導入管15を通って、導入口13から再び培養容器3に導入される。このように液体培地7が流れ状態で培養を行なうことができる、解像度の高い細胞配列を得ることができる。

【0023】本底盤は、ポンプ16の吐出流量を変化させることによって、培地の流れを非常に厳密に制御することができる、実施例1の底盤よりも解像度の高い細胞配列を得ることが可能である。

59

【0024】本発明の導出口112の取り付け位置は、培養容器3内の液体培地7を取り出すことができる位置であれば、本実施例のような液体培地7の液面だけでなく培養容器3側面などの位置に設けてても良い。ただし、導出口12を培養容器3に収容されている基板5に近い位置に設けることは適当でない。本実施例の場合、基板5は培養容器3の底面にあるので、導出口12を培養容器3の底面に近い位置に設けることは適用でない。それは、液体培地7の流れは導出口12付近で局所的に速くなるので、導出口12が基板5の近くにあると、導出口12に近い基板5の表面部分への細胞6の接着が阻害されるからである。そのため、導出口12は培養容器3に収容されている基板5から遠い位置つまり液体培地7の液面に近い位置に設けるのが望ましい。

【0025】本発明の導入口13の取り付け位置は、培養容器3の上部だけでなく側面などの位置に設けてても良い。ただし、導入口13を培養容器3内の液体培地7の液面よりはなれ高い位置に設けると、導入口13からの液体培地7の流れ込みの衝撃により、液体培地7に乱流が生じるので適用でない。また、導入口13は培養容器3に収容されている基板5に近い位置つまり導入口13は培養容器3の底面に近い位置に設けることも適当でない。それは、液体培地7の流れは導入口13付近で局所的に速くなるので、基板5が導入口13の近くにあると、基板5の表面の導入口13に近い部分への細胞6の接着が阻害されるからである。そのため、導入口13は培養容器3に収容されている基板5から遠い位置でかつ液体培地7の液面からあまり高い位置つまり液体培地7の液面に近い位置に設けるのが望ましい。

【0026】本発明の導出管14あるいは導入管15の間に、外側から新たな液体培地7を添加する経路と、使用済みの液体培地7を外側に排出する経路を設けてよい。この場合、培養の際の培地交換の手間が省けるため好適である。

【0027】(実施例4) 次に、第三の発明の細胞配列培養方法の構について説明する。実施は実施例1と同じ箇面を用いた。基板は厚さ0.5mmの石英板であり、基板の表面に部分的に細胞接着性効率であるコラーゲンが接着し、その他の部分は細胞接着性を示さない石英が露出している。一つのコラーゲン接着面は直径100μmの円形であり、多数のコラーゲンの円が間隔100μmで配列している。細胞は、大日本製紙株式会社から購入したヒ由来の肺部血管内皮細胞HUV-EC-C-4を、液体培地は10%の牛臍児血清と10ng/mlのヒアルロン酸接着因子を加えた。クローラ工業株式会社のヒト毛細血管内皮細胞用培地CHL-MCD B131を

使用した。

【0028】操作盤の瓶とう台の傾きを5度、回転速度を毎分30回転に設定し、この瓶とう台の中央に、底部に上記の基板を置き細胞と液体培地とを収納した培養容器を接着テープによって固定した。この細胞配列培養装置を37°C、5%二酸化炭素、飽和水蒸気の条件に設定したインキュベーターの庫内に設置し、培養時間5分後から10分おきに瓶とう台の回転、停止を繰り返しながら24時間培養を行った。その結果、基板表面の石英が突出した部分に比べ、コラーゲンが吸着した円形の部分により多くの血管内皮細胞が接着し、細胞配列が形成された。

【0029】

【発明の効果】以上説明したように、本発明の細胞配列培養装置およびその方法は、液体培地を綴合しながら細胞を培養するので、細胞接着の容易性の異なるパターンを有する基板上において細胞が接着しにくい表面への細胞の接着を抑制し、細胞が接着しやすく加工した表面に多くの細胞を接着させることができ、その結果解像度の高い細胞配列を得ることができる。本発明を利用することにより、培養細胞の人工膜器やバイオセンサへの応用が容易になる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の細胞配列培養装置の一実施例を示した図である。

【図2】本発明の細胞配列培養装置の別の一実施例を示した図である。

【図3】本発明の細胞配列培養装置のさらに別の一実施例を示した図である。

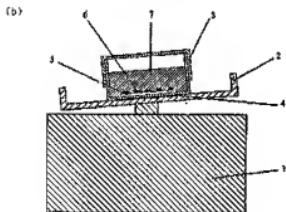
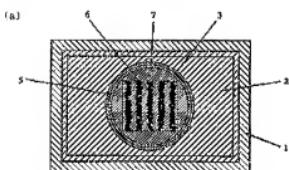
30 【符号の説明】

- 1 培養器
- 2 瓶とう台
- 3 培養容器
- 4 着着テープ
- 5 基板
- 6 細胞
- 7 液体培地
- 8 台
- 9 スペーサ
- 10 細胞体
- 11 瓶
- 12 導出口
- 13 導入口
- 14 導出管
- 15 導入管
- 16 ポンプ

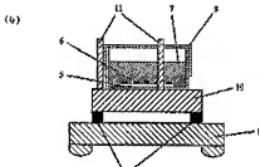
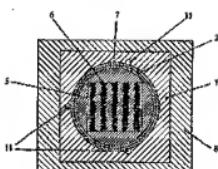
(5)

特開平7-99962

【図1】



【図2】



【図3】

